

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

23-115

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 10-020198

(43)Date of publication of application : 23.01.1998

(51)Int.Cl.

G02B 21/00

G01N 21/35

G02B 21/02

G02B 21/36

// G01N 21/27

(21)Application number : 08-172529

(71)Applicant : OLYMPUS OPTICAL CO LTD

(22)Date of filing : 02.07.1996

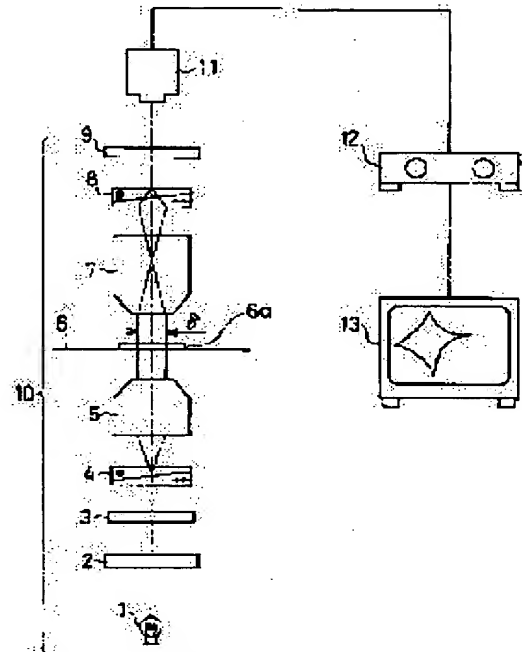
(72)Inventor : ABE KATSUYUKI

(54) NEAR INFRARED MICROSCOPE AND MICROSCOPE OBSERVATION SYSTEM USING THE SAME

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To stably observe an inside cell by providing a wavelength selecting element capable of transmitting optional wavelength out of the wavelength in an area within a specified range arranged between a light source and a sample and a contrast generation optical system.

SOLUTION: The wavelength in the area of 600 to 900nm is transmitted due to the characteristic of the spectral transmittance of a near infrared transmission filter 2 used in this near infrared microscope 10. Furthermore, a Wollaston prism is used as a double refraction optical element 4. Then, the light receiving surface of an electronic image pickup element 11 is arranged on the image-formation surface of the microscope 10, and an image obtained by the microscope 10 is received by the element 11 and transmitted to an image processor 12 as an image signal. The processor 12 is provided with an image processing means increasing the contrast of the image signal, so that the image signal is transmitted to a display monitor 13 after increasing the contrast. Thus, the cell $\geq 100\mu\text{m}$ inside from a surface is observed in the living sample whose thickness is 200 to $300\mu\text{m}$.



LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2000 Japanese Patent Office

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平10-20198

(43)公開日 平成10年(1998) 1月23日

(51)Int.Cl. ⁸	識別記号	序内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 2 B 21/00			G 0 2 B 21/00	
G 0 1 N 21/35			G 0 1 N 21/35	Z
G 0 2 B 21/02			G 0 2 B 21/02	Z
21/36			21/36	
// G 0 1 N 21/27			G 0 1 N 21/27	E
審査請求 未請求 請求項の数 3 O L (全 9 頁)				

(21)出願番号 特願平8-172529

(22)出願日 平成8年(1996) 7月2日

(71)出願人 000000376

オリンパス光学工業株式会社

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号

(72)発明者 阿部 勝行

東京都渋谷区幡ヶ谷2丁目43番2号 オリ

ンパス光学工業株式会社内

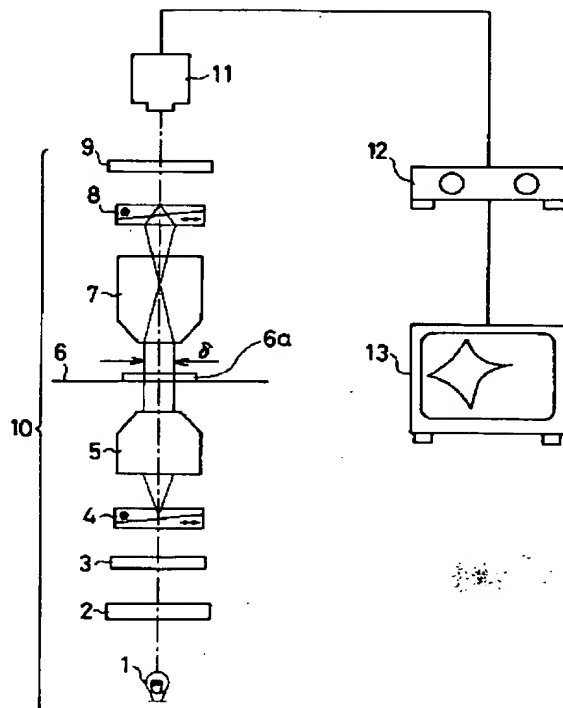
(74)代理人 弁理士 篠原 泰司

(54)【発明の名称】 近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システム

(57)【要約】

【課題】 厚さが200～300 μ mに及ぶ生物試料において、試料表面から100 μ m以上内部の細胞の観察が可能であると同時に、可視光線領域の波長を想定した色収差補正が行われる通常の対物レンズを近赤外線領域で使用しても結像性能には影響を与えることのない近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システムを提供する。

【解決手段】 本発明は、照明用光源であるハロゲンランプ1、近赤外線透過フィルタ2、高分子偏光フィルム3、ハロゲンランプ1からの光を常光線と異常光線とに分離する複屈折光学素子4、コンデンサレンズ5、試料6aが載置されるステージ6、対物レンズユニット7、分離された常光線と異常光線とを再合成する複屈折光学素子8、及び高分子偏光フィルム9からなる近赤外線顕微鏡10と、電子撮像素子11と、画像処理装置12と、表示モニタ13とにより構成されている。



【特許請求の範囲】

【請求項1】 少なくとも赤外光を発生する光源を有し、該光源の照明によって試料観察を行う顕微鏡において、前記光源と前記試料との間に配置された600～900 nmの領域の波長のうち任意の波長を透過し得る波長選択素子と、前記試料にコントラストを発生させるコントラスト発生光学系とが備えられていることを特徴とする近赤外線顕微鏡。

【請求項2】 可視波長に適用し得る対物レンズが備えられていることを特徴とする請求項1に記載の近赤外線顕微鏡。

【請求項3】 請求項1又は2に記載の近赤外線顕微鏡と、該近赤外線顕微鏡による前記試料の像を撮像する撮像手段と、該撮像手段からの画像信号をコントラスト強調する画像処理手段を含む画像処理装置と、画像表示装置とにより構成されていることを特徴とする顕微鏡観察システム。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、透明乃至ほぼ透明な生物試料の内部観察、計測等に用いられる近赤外線顕微鏡とこれを用いた顕微鏡観察システムに関する。

【0002】

【従来の技術】近年、生物学の研究分野においては、従来の形態観察から細胞間の情報伝達機構を調べることに主眼が移りつつある。これに伴い生物試料は可能な限り生態内に近い状態を維持するために、従来よりも厚く（例えば、200～300 nm以上）作製されることが多くなってきている。ところが、試料として用いられる表面付近の細胞は、生態から切り取られる作業時にダメージを受けており、生態に近い状態とは言い難い。従って、生態に近い状態の細胞を観察、計測するためには、細胞の表面より約50 nm以上下層の部分を観察しなければならない。しかし、透明乃至ほぼ透明な試料を可視化するために広く用いられる位相差顕微鏡では、試料の厚さが200～300 μmとなると、ハロと称される位相差顕微鏡特有の現象が生じてしまい、細胞内部の微細構造の観察は困難になる。このことは、「光学顕微鏡の基礎と応用（3）」小松 啓、応用物理第60巻第10号（1991）、1030～1034頁に記載されている。又、微分干渉顕微鏡を用いても、試料の厚さによる光の散乱の影響を強く受け、目視観察では細胞の表面より20～30 μm程度までの内部観察が限界であった。

【0003】そこで、最近になって、散乱の影響の少ない赤外線を微分干渉観察に用い、画像処理によるコントラスト増強とを組み合わせて厚い生物細胞の内部を観察する手法が開発された。この技術内容の詳細は、次の各文献に記載されている。

文献1：Bert Sakmann and Brwin Neher「Single-Chann

el Recording」Second Edition Plenum, New York, P202-206

文献2：Kettenman H., Grantyn R. 「Practical electrophysiological method」 Wiley-Liss, New York, P6-10

(Infrared video microscopy of living brain slices)

文献3：Dodt H.U., Zieglgansberger W. 「Visualizing unstained neurons in living brain slices by infrared DIC-videomicroscopy」 Brain Res 537 (1990), P333-336

又、特に文献3では、厚さ300 μmのラット脳スライスにおいて、この試料の表面より約50～100 μm内部にある神経細胞が観察された旨記載されている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】更に、上記の各文献において、例えば、文献1には、ドイツSchott社製の色ガラスフィルタ（商品名：RG9、分光透過率特性は図8に示したグラフの通りである）を近赤外線透過フィルタとして用いて細胞の観察を行った結果が記載されている。又、文献2には、文献1と同様ドイツSchott社製のRG9若しくは透過率が最大となる波長が750 nmである干渉フィルタにSchott社製の熱吸収フィルタ（商品名：KG4、分光透過率特性は図9に示したグラフの通りである）を組み合わせたものを近赤外線透過フィルタとして用いて細胞の観察を行った結果が記載されている。更に、文献3には、750～1050 nmの領域の波長を透過し得る干渉フィルタを近赤外線透過フィルタとして用いて細胞の観察を行った結果が記載されている。しかし、これら各文献に記載されている近赤外線透過フィルタは、透過する波長領域が概ね700～1200 nmに亘っており、次のような不具合を含むものである。

【0005】まず、顕微鏡の結像光学系、特に対物レンズにより発生する色収差の問題がある。一般に、顕微鏡の対物レンズにおいては、可視光線領域（450～650 nmの波長領域）の波長を想定した色収差の補正がなされる。尚、この色収差補正レベルは、アポクロマート、アクロマートといった名称で示される。例えば、アポクロマート対物レンズとしては、特開平6-160720号公報に開示されたものが知られている。アポクロマート、アクロマートレベルにかかわらず、これらのレベルで色収差補正がなされる対物レンズを近赤外線領域で使用すると、ある単一波長（例えば800 nmの波長）においては、結像位置を可視光線を用いた場合よりもずらしさえすれば良好な結像性能を維持し得るものもあるが、700～1200 nmの領域の波長では、色収差が大きく発生し、試料内部の結像性能の劣化を招く。この結果、散乱の少ない近赤外線を使用しているにもかかわらず、従来技術では、試料表面より約50～100 μm程度の内部の細胞を観察できるにすぎなかった。

【0006】又、700～1200 nmの領域の波長を

用いると、顕微鏡本体の熱変形、試料の温度上昇を引き起こす原因ともなり得る。具体的には、ハロゲンランプを照明用光源として使用することが多いが、このような場合には、900~1100nm付近の放射強度が最も強くなる。ところで、近年、生物学の顕微鏡分野で広く用いられているマニピュレータによって、直径数 μm 程度の微小なガラス電極を細胞膜表面に密着させ、細胞膜のCaイオンチャンネルの電気特性を調べる、所謂パッチクランプ法と呼ばれる手法が用いられている。しかし、この場合、試料上に900~1100nmの波長が到達すると、その熱によって試料がダメージを受けたり、試料を保存する溶液の状態が安定せず、細胞膜表面にガラス電極を密着させることが難しくなるという不具合を生じさせていた。

【0007】そこで、本発明は上記のような従来技術の問題点に鑑みなされたものであり、その目的とするところは、厚さが200~300 μm に及ぶ生物試料において、試料表面から100 μm 以上内部の細胞の観察や細胞に対する操作が安定して行えると同時に、可視光線領域の波長を想定した色収差補正が行われる通常の対物レンズを近赤外線領域で使用しても結像性能に影響を与えない近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システムを提供することである。

【0008】

【課題を解決するための手段】上記目的を達成するために、本発明による近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システムは以下のような特徴を備えている。

【0009】請求項1にかかる発明は、少なくとも赤外光を発生する光源を有し、この光源の照明によって試料観察を行う顕微鏡において、前記光源と前記試料との間に配置された600~900nmの領域の波長のうち任意の波長を透過し得る波長選択素子と、前記試料にコントラストを発生させるコントラスト発生光学系とが備えられた近赤外線顕微鏡である。

【0010】請求項2にかかる発明は、可視波長に適用し得る対物レンズが備えられていることを特徴とする請求項1に記載の近赤外線顕微鏡である。

【0011】請求項3にかかる発明は、請求項1又は2に記載の近赤外線顕微鏡と、この近赤外線顕微鏡による前記試料の像を撮像する撮像手段と、この撮像手段からの画像信号をコントラスト強調する画像処理手段を含む画像処理装置と、画像表示装置とにより構成されている顕微鏡観察システムである。

【0012】

【発明の実施の形態】本発明では、透明乃至ほぼ透明な試料にコントラストを発生させるコントラスト発生光学系として、照明用光源からの波面を等位相の二波面に分割する手段と、この分割手段により分割された波面を試料に向けて照射するコンデンサレンズと、試料を透過した後の前記分割された二波面を再合成し互いに干渉させる

波面合成手段とから構成されている干渉顕微鏡が用いられる。

【0013】或いは、このような干渉顕微鏡に代わって、前記波面分割手段及び波面合成手段に代えて、前記照明用光源と前記コンデンサレンズとの間に、矩形状のスリット、半円形の開口、扇形の開口等を照明系の光軸中心より偏心させて配置し所謂偏斜照明が可能のように構成してもよい。更に、コンデンサレンズの前側焦点位置に光軸中心より偏心させて配置した矩形状のスリットと、対物レンズの後側焦点位置に配置した前記スリットからの透過光の透過率を段階的に変化させ振幅変調を与える変調素子とにより、透明試料にコントラストを発生させるものである。干渉顕微鏡や偏斜照明を利用した顕微鏡は、透明試料にコントラストを発生させる光学系として従来から用いられている位相差顕微鏡では、厚さ200~300 μm の試料に対して、前述の如く、位相差顕微鏡特有のハロと称される現象が強く生じること、又、観察試料内において多重回折が生じ、回折光の位相が乱れて試料内部の観察が困難となるので、これらの不具合を回避するためである。よって、前記コントラスト発生光学系には、位相差顕微鏡に比べ、試料の厚さの影響を受けにくい干渉顕微鏡や偏斜照明を用い、且つ、600~900nmの波長で観察することで、厚い試料であっても深い部分までコントラストよく観察することができる。

【0014】更に、本発明に用いられる干渉顕微鏡において、前記波面分割手段は、前記照明用光源からの光を所定の方向に偏光させる第1の偏光手段と、これにより偏光された光を互いに振動方向が直交する常光線と異常光線とに分離する複屈折光学素子とにより構成されている。又、前記波面合成手段は、前記常光線と異常光線とを再合成する複屈折光学素子と、これにより合成された二波面を互いに干渉させる第2の偏光手段とから構成されている。即ち、本発明に用いられる干渉顕微鏡は所謂ノルムスキー型微分干渉顕微鏡としての構成を有するものである。又、特に、前記第1及び第2の偏光手段は、高分子フィルムに二色性染料を含有、配向させた偏光フィルムにより構成されていることが、コスト、入手性の観点より好ましい。尚、前述の文献2にも記載されているように、偏光素子として、偏光特性に波長依存性のないグラントムソンプリズムを用いることも考えられるが、前記偏光フィルムに比べてグラントムソンプリズムは非常に高価であり、入手も困難であることから、現実的な方法とは云えない。

【0015】一方、前記偏光フィルムは、一般的に、使用される波長が800nmを越えると偏光特性が劣化しはじめ、波長900nm以上ではもはや偏光素子としての機能は失われてしまう。このため、700~1200nmの領域の波長を用いて微分干渉観察を行うと、900~1200nmの波長領域では微分干渉の効果がみら

れず実質的には明視野観察となってしまううえ、700～900 nmの領域の波長により形成された微分干渉像にフレアとなって重なり、散乱の少ない波長を用いているにもかかわらず、試料内の結像性能の劣化を招いてしまう。従って、波長を600～900 nmに限定することによって、安価な偏光フィルムを使用しても偏光特性が劣化しないので、コントラストのよい観察ができるという効果を奏する。

【0016】このような観点により、本発明においては、近赤外線透過フィルタを前記照明用光源と前記試料との間に配置し、而も、この近赤外線透過フィルタを、600～900 nmの領域内の波長より観察に必要とされる最小限の明るさが得られる波長域を任意に選択できるように構成した。又、このような近赤外線フィルタを用いると、ハロゲンランプの放射強度が強い900～1100 nm付近の波長を使用していないため、試料の温度上昇を最小限に抑制できることは言うまでもない。

【0017】更に、前記近赤外線透過フィルタは、70*

$$0.25\epsilon < \delta < 0.7\epsilon$$

但し、分解能 ϵ は、546.07 nmの波長(ϵ 線)における値である。

【0019】条件式(1)は、厚い生物試料内部の観察において、より一層良好な解像、立体感を得るために設定されたものである。前記常光線と異常光線との分離量 δ の大小により、微分干渉顕微鏡における解像、立体感が相反する関係にあることは周知の通りであるが、前述のように、厚さが200～300 μ mの生物試料内部の細胞に対して前記パッチクランプ法を行う際、細胞膜表面の視認性のよさが成否の鍵を握っており、そのためには、解像と立体感とのバランスを図ることが重要である。条件式(1)において、分離量 δ が0.25 ϵ 以下になると、試料の厚さによる錯乱の影響は低減され、又、解像力も向上させることができるが、コントラストが低くなりすぎてしまう。これを画像処理装置によるコントラスト増強で補うには、コントラスト増強の原理上、S/N比を高めるために試料への入射光量を必要以上に増加させねばならず、結果、顕微鏡本体の熱変形、試料の温度上昇を招くことになり好ましくない。一方、分離量 δ が0.7 ϵ 以上になると、解像力の低下を招くことは勿論、試料の厚さによる錯乱の影響を大きく受け、本来ならば向上するはずの試料像の立体感まで低下させてしまう。

【0020】次に、本発明において用いられる対物レンズについて説明する。図10は前述の特開平6-160720号公報に開示されているアポクロマート級顕微鏡の対物レンズの構成を示す断面図、図11は図10に示された対物レンズにおいて基準波長を587.56 nm(d 線)とした場合の400～700 nmの領域の波長に対する色収差を表すグラフ(縦軸は軸上波面収差の値、横軸は波長を示している)である。又、図12は図※50

*0～850 nmの領域の波長を透過し、特に、750～800 nmの領域の波長の平均透過率が80%以上となっていることが好ましい。この条件は、試料内部の観察において、より一層良好な解像を得るために設けられる条件である。近赤外線の透過波長領域が700～850 nmから逸脱して広範囲に亘ると、偏光素子として前記偏光フィルムが用いられているノマルスキー型微分干渉顕微鏡においては、850 nm以上の波長で前記偏光フィルムの偏光特性劣化が目立ちはじめ、コントラストの低下を招いてしまう。一方、750～800 nmの領域の波長において、平均透過率が80%以下であると、得られる像が暗くなり、例えば画像処理装置によりコントラスト増強を行っても、試料内部の微細構造は電気ノイズに埋もれてしまい観察できなくなる。

【0018】更には、前記ノマルスキー型微分干渉顕微鏡において、前記波面分割手段による常光線と異常光線との分離量 δ が、対物レンズの分解能 ϵ に対して、以下に示す条件式を満足していることが好ましい。

$$\dots (1)$$

※10に示された対物レンズにおいて基準波長を900 nmとした場合の700～1200 nmの領域の波長に対する色収差を表すグラフ、図13は同様に前記対物レンズにおいて基準波長を750 nmとした場合の700～900 nmの領域の波長に対する色収差を表すグラフである。無収差の目安として、Marechalの判定値(約0.07波長)を考えると、図11に示されたグラフより、図10に示した対物レンズは可視光線領域では確かにアポクロマート級の色収差補正を行っている。ところが、図12に示されたグラフから分かるように、基準波長が900 nmの場合、観察に用いる波長の領域が700～1200 nmの広範囲に亘ると、アポクロマート級の対物レンズとはいえ、色収差が大きく発生している。そこで、図13に示すように、基準波長を750 nmとし、観察する波長の領域を600～900 nmに設定すれば、色収差の発生が低く抑えられることが分かる。

【0021】このように、観察に用いられる波長の領域が700～1200 nmの広範囲に亘る場合には、前記アポクロマート級の対物レンズでさえも色収差が大きく発生する。しかしながら、本発明では、前述のように、600～900 nmの波長を透過し得る近赤外線フィルタを採用しているため、可視光線領域、即ち、約450～650 nmの領域の波長において色収差補正がなされる通常の顕微鏡の対物レンズをそのまま使用しても色収差の発生を最小限に抑制することができる。従って、本発明では、実用上広く用いられているアポクロマート級対物レンズを用いることができるため、コスト面でも有利である。

【0022】尚、ここで、可視光線領域から近赤外線領域までの領域の波長に対して色収差の補正が可能な対物

レンズを新たに設計する方法もある。しかし、近年、生物学の研究分野においては、Caイオン濃度等を計測するために、落射蛍光照明装置を用い、340~380nm付近の紫外線を試料に照射することが頻繁に行われている。よって、対物レンズには紫外線透過率が高いものが要求されることになる。しかしながら、このような要求を全て満たす対物レンズ、即ち、可視光線領域から近赤外線領域までの領域の波長に対して色収差の補正が可能で、且つ、紫外線透過率の高い対物レンズの設計、製作は非常に困難である。又、大きなコスト増にもつながるため、適切な解決手段とは云えない。

【0023】以下、図示した実施例に基づき本発明を具体的に説明する。

【0024】第1実施例

図1は、本実施例にかかる顕微鏡観察システムの構成を示す図である。本実施例の顕微鏡観察システムに用いられる近赤外線顕微鏡10は、照明用光源であるハロゲンランプ1、近赤外線透過フィルタ2、高分子偏光フィルム3、ハロゲンランプ1からの光を常光線と異常光線とに分離する複屈折光学素子4、コンデンサレンズ5、試料6aが載置されるステージ6、対物レンズユニット7、分離された常光線と異常光線とを再合成する複屈折光学素子8、及び高分子偏光フィルム9により構成されている。

【0025】この近赤外線顕微鏡10では、ハロゲンランプ1から射出された光が近赤外線透過フィルタ2を透過し、高分子偏光フィルム3により直線偏光とされた後、コンデンサレンズ5の前側焦点位置に常光と異常光との分岐点が一致するように配置された複屈折光学素子4によりコンデンサレンズ5を介して試料6a上で常光と異常光とを分離量 δ だけ分離させている。そして、試料6aを透過した常光と異常光は対物レンズユニット7を透過した後、複屈折光学素子8により合波され、更に高分子偏光フィルム9を透過する際に前記常光と異常光とが互いに干渉し合い、近赤外線顕微鏡10の結像面に試料6aの像を形成するようになっている。

【0026】ここで、近赤外線顕微鏡10に用いられている近赤外線透過フィルタ2の分光透過率特性は、図2に示すように、600~900nmの領域の波長を透過し得るものであり、対物レンズユニット7の倍率は水浸40倍、開口数は0.7、常光線と異常光線との分離量 δ は0.3 μ mである。更に、本実施例では、複屈折光学素子4としてウオラストンプリズムを用い、又、複屈折光学素子8としては対物レンズユニット7の後側焦点位置が対物レンズユニット7内に存在しているため、ノマルスキープリズムと呼ばれる変形ウオラストンプリズムを用いている。

【0027】更に、本実施例の顕微鏡観察システムでは、近赤外線顕微鏡10の結像面上に電子撮像素子11の受光面を配置し、この電子撮像素子11で近赤外線顕

微鏡10により得られた像を受像し、これを画像信号として画像処理装置12へ送信する。画像処理装置12には、前記画像信号のコントラスト増強を行う画像処理手段が備えられており、ここでコントラスト増強がなされた画像信号は表示モニタ13へ送信される。

【0028】第2実施例

本実施例にかかる顕微鏡観察システムの構成は図1に示した第1実施例のものと同様であるため、図は省略する。尚、本実施例の顕微鏡観察システムにおいて、近赤外線透過フィルタ2の分光透過率特性は、図3に示すように、700~850nmの領域の波長を透過し得るものである。又、対物レンズユニット7の倍率は水浸60倍、開口数は1.2、常光線と異常光線との分離量 δ は0.08 μ mである。

【0029】第3実施例

図4は、本実施例にかかる顕微鏡観察システムの構成を示す図である。本実施例の顕微鏡観察システムに用いられる近赤外線顕微鏡20は、照明用光源であるハロゲンランプ1、近赤外線透過フィルタ14、照明系の光軸の中心より偏心させて配置された矩形形状のスリット15、コンデンサレンズ16、試料17aを載置するステージ17、対物レンズユニット18、及び矩形形状のスリット15を透過する光の透過率を段階的に変化させその透過光に振幅変調を与える変調素子19により構成されている。

【0030】この近赤外線顕微鏡20では、ハロゲンランプ1から射出された光が近赤外線透過フィルタ14を透過し、矩形形状のスリット15及びコンデンサレンズ16を経てステージ17上に載置されている試料17aに入射する。この試料17aへ照明光が入射するまでの過程において、変調素子19により矩形形状のスリット15を透過する光の透過率を段階的に変化させその透過光に振幅変調を与えている。よって、試料17aに入射した光は透明な試料17aにコントラストを発生させることができる。そして、試料17aを透過した光は対物レンズユニット18及び変調素子19を経て、近赤外線顕微鏡20の結像面に試料17aの像を形成する。

【0031】ここで、近赤外線顕微鏡20に用いられる近赤外線透過フィルタ14の分光透過率特性は、図2に示すように、600~900nmの領域の波長を透過し得るものである。対物レンズユニット18の倍率は水浸40倍、開口数は0.7である。矩形形状のスリット15はコンデンサレンズ16の前側焦点位置に、変調素子19は対物レンズユニット18の後側焦点位置に夫々配置されている。又、図5及び図6に、矩形形状のスリット15及び変調素子19を夫々上側から見た状態を示す。尚、図6において、白色部分の光の透過率は約90%以上、斜線部分の光の透過率は約15%、黒色部分の光の透過率は0%である。

【0032】更に、本実施例の顕微鏡観察システムにお

いても、第1実施例と同様に、近赤外線顕微鏡20の結像面上に電子撮像素子11の受光面を配置し、この電子撮像素子11で近赤外線顕微鏡20により得られた像を受像し、これを画像信号として画像処理装置12へ送信する。画像処理装置12には、前記画像信号のコントラスト増強を行う画像処理手段が備えられており、ここでコントラスト増強がなされた画像信号は表示モニタ13へ送信される。

【0033】次に、第2実施例に示した顕微鏡観察システムを用いた具体的な観察方法を示す。近赤外線顕微鏡10として使用した微分干渉顕微鏡はオリンパス光学工業(株)製BHWIで、照明光路中に図3に示したような700~850nmの領域の波長を透過し得る近赤外線透過フィルタ2を配置し、試料6aにはラット脳スライスの小脳部分を、対物レンズユニット7には水浸タイプのオリンパス光学工業(株)製WPlanF140×UV(開口数0.7)と2.5倍の拡大レンズとを組み合わせたものを用いた。又、電子撮像素子11としては、浜松ホトニクス(株)製の可視~近赤外線用テレビカメラC2741-07ERを、画像処理装置12には

オリンパス光学工業(株)製の画像処理装置XL-10を、表示モニタ13には浜松ホトニクス(株)製のテレビモニタC1840-3を用いた。

【0034】このようなシステムにより、前記対物レンズユニット7を介して電子撮像素子11に総合倍率100倍で試料6aの像を投影し、電子撮像素子11で生成された画像信号は前記画像処理装置12を介して表示モニタ13へ送信され、ここに画像を表示した。更に、この表示モニタ13上に表示された画像を日立製作所

(株)製のビデオプリンタVY-100で画像出力した図を図7に示す。図7は、従来の方法ではなし得なかった試料表面より約150μm内部にある神経細胞を観察できたことを示している。尚、ここに示した観察方法では、正立型の顕微鏡を用いているが、本発明ではこれに限られるものではなく、倒立型の顕微鏡を用いても同様の効果を得ることができる。

【0035】以上説明したように、本発明による近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システムは、特許請求の範囲に記載された特徴と合わせ、以下の(1)~(6)に示された特徴も備えている。

【0036】(1)照明光源と、この照明光源からの光により透明乃至ほぼ透明な試料を照明するコンデンサレンズと、前記試料の像を形成する対物レンズを含む結像光学系と、前記試料の拡大像を撮像する撮像手段と、前記照明用光源と前記撮像手段との間に配置される前記試料にコントラストを発生させて可視化する手段と、前記撮像手段からの画像信号を処理して前記試料像のコントラストを強調する画像処理手段とにより構成され、前記撮像手段は前記結像光学系の結像面に配置された電子撮像素子を有し、又、前記照明用光源と前記試料との間に

は600~900nmの領域の波長のうち任意の波長を透過し得る近赤外線透過フィルタが配置されていることを特徴とする顕微鏡観察システム。

【0037】(2)前記透明乃至ほぼ透明な試料にコントラストを発生させる手段は、前記照明用光源からの波面を等位相の二波面に分割する手段と、前記分割面にて試料を照明するコンデンサレンズと、前記試料を透過した後の前記分割二波面を再合成し互いに干渉させる波面合成手段とを備えた干渉顕微鏡で構成されていることを特徴とする前記(1)に記載の顕微鏡観察システム。

【0038】(3)前記透明乃至ほぼ透明な試料にコントラストを発生させて可視化する手段は、偏斜照明を用いた手段であることを特徴とする前記(1)に記載の顕微鏡観察システム。

【0039】(4)前記波面分割手段は前記照明用光源からの光を所定の方向に偏光させる第1の偏光手段とこれにより偏光された光を互いに振動方向が直交する常光線と異常光線とに分離する複屈折光学素子とからなり、又、前記波面合成手段は前記常光線と異常光線とを再合成する複屈折光学素子とこれにより合成された光を互いに干渉させる第2の偏光手段とからなっており、前記第1及び第2の偏光手段は高分子フィルムに二色性染料を含有、配向させた偏光フィルムで構成されていることを特徴とする前記(2)に記載の顕微鏡観察システム。

【0040】(5)前記近赤外線透過フィルタは、700~850nmの領域の波長の平均透過率が80%以上であることを特徴とする前記(1)又は(4)に記載の顕微鏡観察システム。

【0041】(6)前記波面分割手段による前記常光線と異常光線との分離量 δ を、前記対物レンズの分解能 ϵ に対して以下に示す条件式を満足するようにしたことを特徴とする前記(4)に記載の顕微鏡観察システム。

$$0.25\epsilon < \delta < 0.7\epsilon$$

但し、分解能 ϵ は、546.07nmの波長(ϵ 線)における値である。

【0042】

【発明の効果】上述のように、本発明によれば、厚さが200~300μmの透明乃至ほぼ透明な生物試料において、その試料表面から100μm以上内部の細胞が観察可能であると共に、可視光線領域の波長を想定した色収差補正を行う通常の対物レンズを近赤外線領域で用いても結像性能に影響を及ぼすことのない近赤外線顕微鏡及びこれを用いた顕微鏡観察システムを提供することができる。

【図面の簡単な説明】

【図1】第1実施例にかかる顕微鏡観察システムの構成を示す図である。

【図2】第1、第3実施例の顕微鏡観察システムに用いられる近赤外線透過フィルタの分光透過率特性を示すグ

ラフである。

【図3】第2実施例の顕微鏡観察システムに用いられる近赤外線透過フィルタの分光透過率特性を示すグラフである。

【図4】第3実施例にかかる顕微鏡観察システムの構成を示す図である。

【図5】第3実施例の顕微鏡観察システムに用いられる矩形形状のスリット15の形状を示す図である。

【図6】第3実施例の顕微鏡観察システムに用いられる変調素子19の形状を示す図である。

【図7】第2実施例の顕微鏡観察システムを用いて行ったラット脳スライス（小脳部分）の観察画像を示す図である。

【図8】ドイツSchott社製の色ガラスフィルタRG9の分光透過率特性を示すグラフである。

【図9】ドイツSchott社製の熱吸収フィルタKG4の分光透過率特性を示すグラフである。

【図10】特開平6-160720号公報に開示されているアポクロマート級顕微鏡の対物レンズの構成を示す断面図である。

【図11】図10に示された対物レンズにおいて、基準波長を587.56nm（d線）とした場合の400～700nmの領域の波長に対する色収差を示すグラフである。

ある。

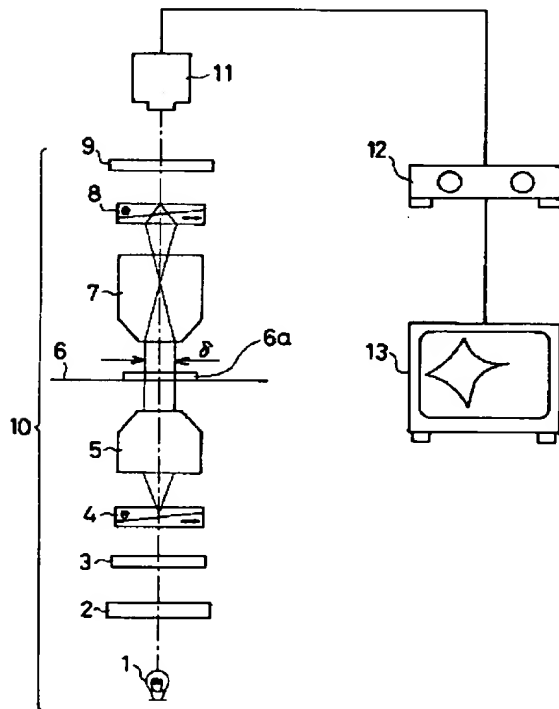
【図12】図10に示された対物レンズにおいて、基準波長を900nmとした場合の700～1200nmの領域の波長に対する色収差を示すグラフである。

【図13】図10に示された対物レンズにおいて、基準波長を750nmとした場合の700～900nmの領域の波長に対する色収差を示すグラフである。

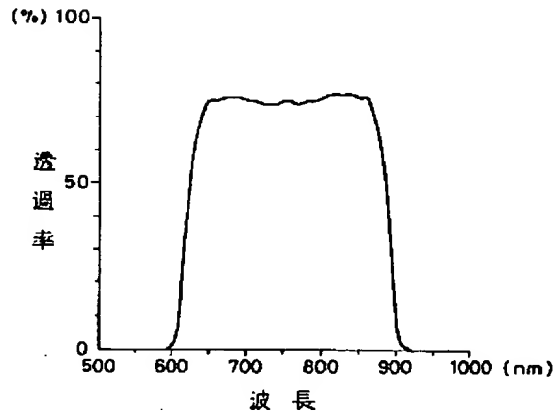
【符号の説明】

- | | |
|---------|-----------|
| 1 | ハロゲンランプ |
| 2, 14 | 近赤外線フィルタ |
| 3, 9 | 高分子偏光フィルム |
| 4, 8 | 複屈折光学素子 |
| 5, 16 | コンデンサレンズ |
| 6, 17 | ステージ |
| 6a, 17a | 試料 |
| 7, 18 | 対物レンズユニット |
| 10, 20 | 近赤外線顕微鏡 |
| 11 | 電子撮像素子 |
| 12 | 画像処理装置 |
| 13 | 表示モニタ |
| 15 | 矩形形状のスリット |
| 19 | 変調素子 |

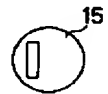
【図1】



【図2】



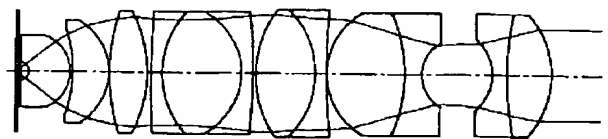
【図5】



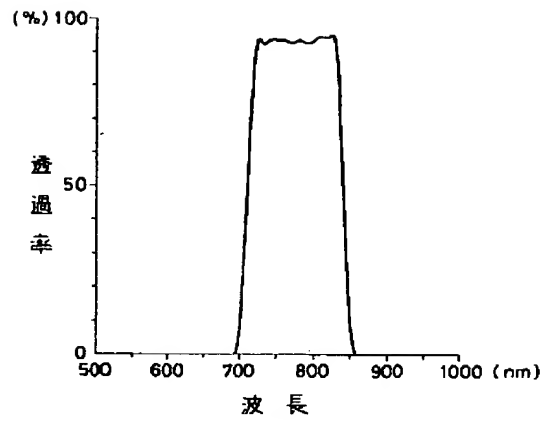
【図6】



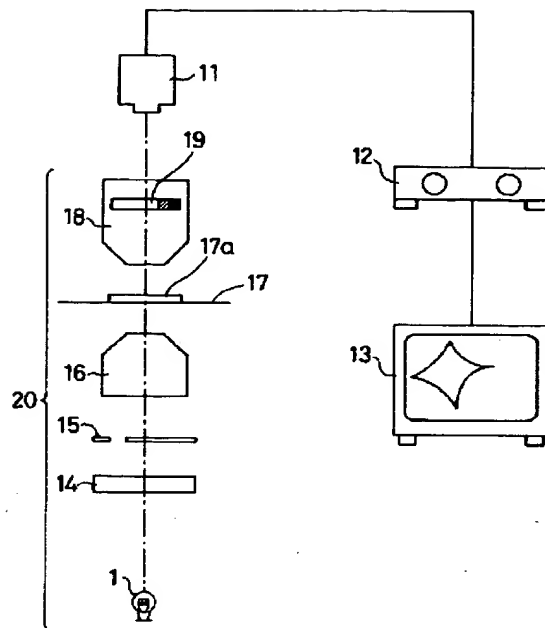
【図10】



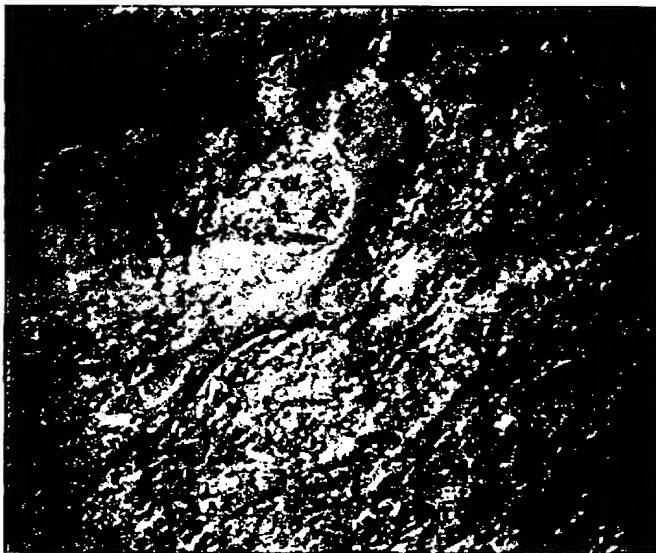
【図3】



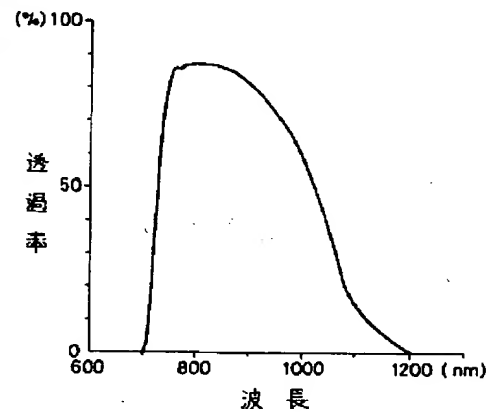
【図4】



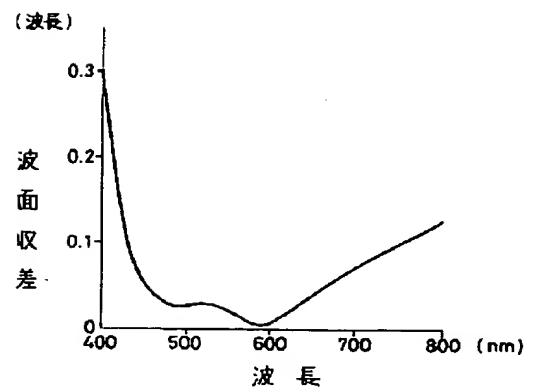
【図7】



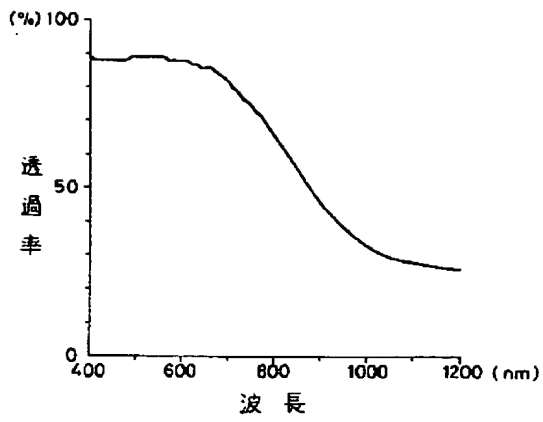
【図8】



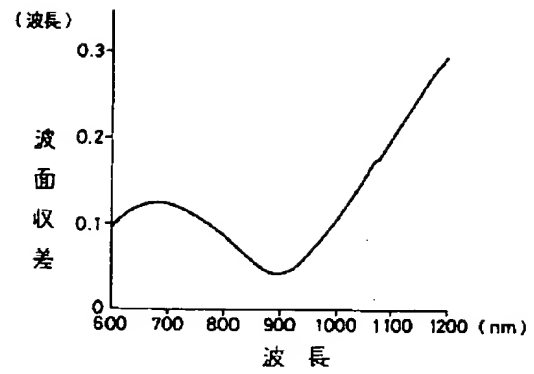
【図11】



【図9】



【図12】



【図13】

